



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 18 614 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 198 18 614.2
㉑ Anmeldetag: 20. 4. 98
㉒ Offenlegungstag: 21. 10. 99

㉓ Int. Cl.⁶:
C 07 C 311/21
C 07 D 227/00
C 07 D 239/70
A 61 K 31/18
A 61 K 31/435
A 61 K 31/505
// C07D 521/00

DE 198 18 614 A 1

㉔ Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

㉕ Erfinder:
Lubisch, Wilfried, Dr., 68159 Mannheim, DE; Möller,
Achim, Dr., 67269 Grünstadt, DE; Treiber,
Hans-Jörg, Dr., 68782 Brühl, DE; Knopp, Monika,
Dr., 68161 Mannheim, DE

BEST AVAILABLE COPY

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉖ Neue substituierte Amide, deren Herstellung und Anwendung

DE 198 18 614 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Amide, die Inhibitoren von Enzymen, insbesondere Cystein-Proteasen, wie Calpain (= Calcium dependant cysteine proteases) und dessen Isoenzyme und Cathepsine, zum Beispiel B und L, darstellen.

Calpaine stellen intracelluläre, proteolytische Enzyme aus der Gruppe der sogenannten Cystein-Proteasen dar und werden in vielen Zellen gefunden. Calpaine werden durch erhöhte Kalziumkonzentration aktiviert, wobei man zwischen Calpain I oder γ -Calpain, das durch γ -molare Konzentrationen von Kalzium-Ionen aktiviert wird, und Calpain II oder m-Calpain, das durch m-molare Konzentrationen von Kalzium-Ionen aktiviert wird, unterscheidet (P. Johnson, Int.J.Biochem. 1990, 22 (8), 811-22). Heute werden noch weitere Calpain-Isoenzyme postuliert (K. Suzuki et al., Biol.Chem. Hoppe-Seyler, 1995, 376 (9), 523-9).

Man vermutet, daß Calpaine in verschiedenen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören Spaltungen von regulatorischen Proteinen wie Protein-Kinase C, Cytoskelett-Proteine wie MAP 2 und Spektrin, Muskelproteine, Proteinabbau in rheumatoider Arthritis, Proteine bei der Aktivierung von Plättchen, Neuropeptid-Metabolismus, Proteine in der Mitose und weitere, die in M. J. Barrett et al., Life Sci. 1991, 48, 1659-69 und K. K. Wang et al., Trends in Pharmacol.Sci., 1994, 15, 412-9 aufgeführt sind.

Bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen wurden erhöhte Calpain-Spiegel gemessen, zum Beispiel: Ischämien des Herzens (z. B. Herzinfarkt), der Niere oder des Zentralnervensystems (z. B. "Stroke"), Entzündungen, Muskeldystrophien, Katarakten der Augen, Verletzungen des Zentralnervensystems (z. B. Trauma), Alzheimer Krankheit usw. (siehe K. K. Wang, oben). Man vermutet einen Zusammenhang dieser Krankheiten mit erhöhten und anhaltenden intrazellulären Kalziumspiegeln. Dadurch werden Kalziumabhängige Prozesse überaktiviert und unterliegen nicht mehr der physiologischen Regelung. Dementsprechend kann eine Überaktivierung von Calpainen auch pathophysiologische Prozesse auslösen.

Daher wurde postuliert, daß Inhibitoren der Calpain-Enzyme für die Behandlung dieser Krankheiten nützlich sein können. Verschiedene Untersuchungen bestätigen dies. So haben Seung-Chyul Hong et al., Stroke 1994, 25 (3), 663-9 und R. T. Bartus et al., Neurological Res. 1995, 17, 249-58 eine neuroprotektive Wirkung von Calpain-Inhibitoren in akuten neurodegenerativen Störungen oder Ischämien, wie sie nach Hirnschlag auftreten, gezeigt. Ebenso nach experimentellen Gehirntraumata verbesserten Calpain-Inhibitoren die Erholung der auftretenden Gedächtnisleistungsdefizite und neuromotorischen Störungen (K. H. Saalman et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1996, 93, 3428-3433). C. L. Edelstein et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1995, 92, 7662-6, fand eine protektive Wirkung von Calpain-Inhibitoren auf durch Hypoxie geschädigten Nieren. Yoshida, Ken Ischi et al., Jap.Circ.J. 1995, 59(1), 40-8, konnten günstige Effekte von Calpain-Inhibitoren nach cardialen Schädigungen aufzeigen, die durch Ischämie oder Reperfusion erzeugt wurden. Da Calpain-Inhibitoren die Freisetzung von dem β -AP4-Protein hemmen, wurde eine potentielle Anwendung als Therapeutikum der Alzheimer Krankheit vorgeschlagen (J. Higaki et al., Neuron, 1995, 14, 651-59). Die Freisetzung von Interleukin-1 α wird ebenfalls durch Calpain-Inhibitoren gehemmt (N. Watanabe et al., Cytokine 1994, 6(6), 597-601). Weiterhin wurde gefunden, daß Calpain-Inhibitoren cytotoxische Effekte an Tumorzellen zeigen (R. Shiba et al. 20th Meeting Int.Ass.Breast Cancer Res., Sendai Jp, 1994, 25. 28. Sept., Int.J.Oncol. 5(Suppl.), 1994, 381). Weitere mögliche Anwendungen von Calpain-Inhibitoren sind in K. K. Wang, Trends in Pharmacol.Sci., 1994, 15, 412-8, aufgeführt.

Calpain-Inhibitoren sind in der Literatur bereits beschrieben worden. Überwiegend sind dies jedoch entweder irreversible oder peptidische Inhibitoren. Irreversible Inhibitoren sind in der Regel alkylierende Substanzen und haben den Nachteil, daß sie im Organismus unselektiv reagieren oder instabil sind. So zeigen diese Inhibitoren oft unerwünschte Nebeneffekte, wie Toxizität, und sind danach in der Anwendung eingeschränkt oder nicht brauchbar. Zu den irreversiblen Inhibitoren kann man zum Beispiel die Epoxide B 64 (B. B. McGowan et al., Biochem.Biophys.Res.Comm. 1989, 158, 432-5), α -Halogenketone (H. Angliker et al., J.Med.Chem. 1992, 35, 216-20) oder Disulfide (R. Matsueda et al., Chem.Lett. 1990, 191-194) zählen.

Viele bekannte reversible Inhibitoren von Cystein-Proteasen wie Calpain stellen peptidische Aldehyde dar, insbesondere dipeptidische und tripeptidische Aldehyde wie zum Beispiel Z-Val-Phe-II (MDL 28170) (S. Mehdi, Trends in Biol.Sci. 1991, 16, 150-3). Unter physiologischen Bedingungen haben peptidische Aldehyde den Nachteil, daß sie auf Grund der großen Reaktivität häufig instabil sind, schnell metabolisiert werden können und zu unspezifischen Reaktionen neigen, die die Ursache von toxischen Effekten sein können (J. A. Fehrentz und B. Castro, Synthesis 1983, 676-78).

In JP 08183771 (CA 1996, 605307) und in EP 520336 sind Aldehyde, die sich von 4-Piperidinoylamide und 1-Carboxyl-piperidin-4-ylamide ableiten als Calpain-Inhibitoren beschrieben worden. Jedoch sind die hier beanspruchten Aldehyde, die sich von heteroaromatisch substituierten Amiden der allgemeinen Struktur I ableiten bisher noch beschrieben worden. Andere Aldehyd-Derivate sind in Chatterjee et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1997, 7, 287-290, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1996, 6, 1619-1622, WO 97/10231 und WO 97/21690 beschrieben worden.

Peptidische Keton-Derivate sind ebenfalls Inhibitoren von Cystein-Proteasen, insbesondere Calpaine. So sind zum Beispiel bei Serin-Proteasen Keton-Derivate als Inhibitoren bekannt, wobei die Keto-Gruppe von einer elektronenziehenden Gruppe wie CF_3 aktiviert wird. Bei Cystein-Proteasen sind Derivate mit durch CF_3 oder ähnlichen Gruppen aktivierte Ketone wenig oder nicht wirksam (M. R. Angelastro et al., J. Med. Chem. 1990, 33, 11-13). Überraschenderweise konnten bei Calpain bisher nur Keton-Derivate, bei denen einerseits α -ständige Abgangsgruppen eine irreversible Hemmung verursachen und andererseits ein Carbonsäure-Derivat die Keto-Gruppe aktiviert, als wirksame Inhibitoren gefunden werden (siehe M. R. Angelastro et al., siehe oben; WO 92/11850; WO 92,12140; WO 94/00095 und WO 95/00535). Jedoch sind von diesen Ketoamiden und Ketoestern fast nur peptidische Derivate als wirksam beschrieben worden (Zhaozhao Li et al., J.Med.Chem. 1993, 36, 3472-80; S. L. Harbenson et al., J.Med.Chem. 1994, 37, 2918-29 und siehe oben M. R. Angelastro et al.). Lediglich in Chatterjee et al. (siehe oben) ist ein Xanthen-Derivat eines Ketobenzamids als Calpain-Inhibitor beschrieben worden.

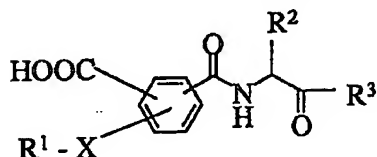
Ketobenzamide sind bereits in der Literatur bekannt. So wurde der Ketoester $\text{PhCO-Abu-COOCH}_2\text{CH}_3$ in WO 91/09801, WO 94/00095 und 92/11850 beschrieben. Das analoge Phenyl-Derivat $\text{Ph-C(=O)NH-CH(CH}_2\text{Ph)-CO-CO-}$

COOCH₃ wurde in M. R. Angelastro et al., J. Med. Chem. 1990, 33, 11-13 als jedoch nur schwacher Calpain-Inhibitor gefunden. Dieses Derivat ist auch in J. P. Burkhardt, Tetrahedron Lett., 1988, 3433-36 beschrieben. Die Bedeutung der substituierten Benzamide ist jedoch bisher nie untersucht worden.

In einer Reihe von Therapien wie Schlaganfall werden die Wirkstoffe intravenös als Infusionslösung appliziert. Dazu ist es notwendig Substanzen, hier Calpain-Inhibitoren, zur Verfügung zu haben, die ausreichende Wasserlöslichkeit aufweisen, so daß eine Infusionslösung hergestellt werden kann. Viele der beschriebenen Calpain-Inhibitoren haben jedoch den Nachteil, daß sie nur geringe oder keine Wasserlöslichkeit zeigen und somit nicht für eine intravenöse Applikation in Frage kommen. Derartige Wirkstoffe können nur mit Hilfsstoffen, die die Wasserlöslichkeit vermitteln sollen, appliziert werden (vgl. R. T. Bartus et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. 1994, 14, 537-544). Diese Hilfsstoffe, zum Beispiel Polyethylenglykol, haben aber häufig Begleiteffekte oder sind sogar unverträglich. Ein nicht-peptidischer Calpain-Inhibitor, der also ohne Hilfsstoffe wasserlöslich und damit wahrscheinlich mit besserer Verträglichkeit applizierbar ist, weist somit einen großen Vorteil auf. Gut wirksame nicht-peptidische Calpain-Inhibitoren mit ausreichender Wasserlöslichkeit sind bisher nicht beschrieben worden und wären damit neu.

In der vorliegenden Erfindung wurden nicht-peptidische Aldehyde, Ketocarbonsäureester und Ketoamid-Derivate beschrieben. Diese Verbindungen sind neu und zeigen überraschenderweise die Möglichkeit auf, durch Einbau von rigiden strukturellen Fragmenten potente nicht-peptidische Inhibitoren von Cystein-Proteasen, wie z. B. Calpain, zu erhalten. Weiterhin sind bei den vorliegenden Verbindungen der allgemeinen Formel I, die alle mindestens ein aliphatisches Amin-Rest tragen Salz-Bindungen mit Säuren möglich. Dies führt zu einer verbesserten Wasserlöslichkeit und damit zeigen die Verbindungen das gewünschte Profil für eine intravenöse Applikation, wie sie zum Beispiel bei der Schlaganfall-Therapie erforderlich ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind substituierte Amide der allgemeinen Formel I



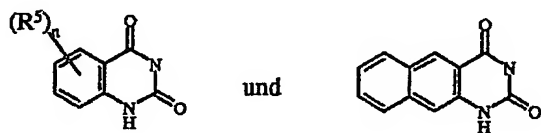
und ihre tautomeren und isomeren Formen, möglichen enantiomeren und diastereomeren Formen, sowie mögliche physiologisch verträgliche Salze, worin die Variablen folgende Bedeutung haben:

R¹ C₁-C₆-Alkyl, Phenyl, Naphthyl, Chinolyl, Pyridyl, Pyrimidyl, Pyridazyl, Chinazolyl und Chinoxalyl, bedeuten kann, wobei die Ringe noch mit zu bis 2 Resten R⁴ substituiert sein können, und

R² -(CH₂)_m- R⁸, wobei R⁸ Phenyl, Cyclohexyl -oder Indolyl und m=1 bis 6 sein kann, und

X eine Bindung, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, CONH-, SO₂NH- und bedeutet und

R¹-X zusammen auch



bedeuten und

R³ Wasserstoff und CO-NR⁶R⁷ bedeutet,

R⁴ Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, verzweigt oder unverzweigt und -O-C₁-C₄-Alkyl bedeutet;

R⁵ Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, verzweigt oder unverzweigt und -O-C₁-C₄-Alkyl bedeutet;

R⁶ Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl, verzweigt und unverzweigt, bedeutet, und

R⁷ Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl, verzweigt oder unverzweigt, bedeutet, und

n eine Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet bedeutet.

Besonders bevorzugt werden Verbindungen der allgemeinen Struktur 1, in denen die Variablen folgende Bedeutung haben:

R¹ Phenyl, Naphthyl, Butyl und Chinolyl und

R² Benzyl

R³ Wasserstoff und CONH₂ und

X SO₂NH

R⁴ Wasserstoff.

Die Verbindungen der Formel I können als Racemate, als enantiomerenreine Verbindungen oder als Diastereomere eingesetzt werden. Werden enantiomerenreine Verbindungen gewünscht, kann man diese beispielsweise dadurch erhalten, daß man mit einer geeigneten optisch aktiven Base oder Säure eine klassische Racematspaltung mit den Verbindungen der Formel I oder ihren Zwischenprodukten durchführt. Andererseits können die enantiomeren Verbindungen ebenfalls durch Einsatz von kommerziell erwerbbaaren Verbindungen, zum Beispiel optisch aktive Aminosäuren wie Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, hergestellt werden.

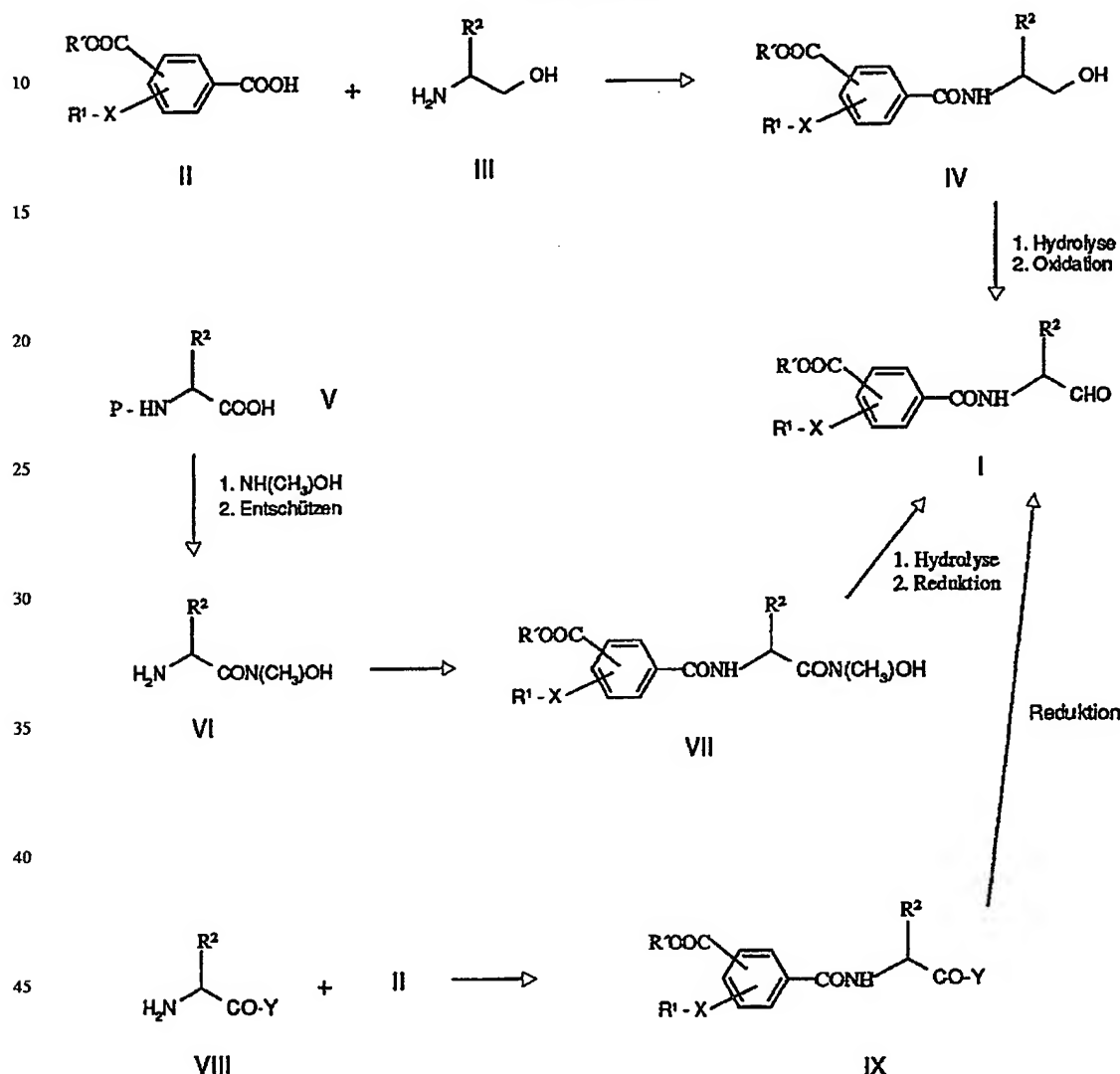
Gegenstand der Erfindung sind auch zu Verbindungen der Formel I mesomere oder tautomere Verbindungen, beispielsweise solche, bei denen die Aldehyd- oder Ketogruppe der Formel I als Enol-Tautomeres vorliegt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die physiologisch verträglichen Salze der Verbindungen I, die sich durch Umsatz von Verbindungen I mit einer geeigneten Säure oder Base erhalten lassen. Geeignete Säuren und Basen sind zum Beispiel in Fortschritte der Arzneimittelforschung, 1966, Birkhäuser Verlag, Bd. 10, S. 224-285, aufgelistet. Dazu zäh-

len zum Beispiel Salzsäure, Citronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Fumarsäure usw. bzw. Natriumhydroxid, Lithiumhydroxid, Kaliumhydroxid und Tris.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Amide I, die eine Aldehyd-Gruppe tragen, kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, die im Syntheschema 1 skizziert wurde.

Syntheschema 1



Karbonsäuren II werden mit geeigneten Aminoalkoholen III zu den entsprechenden Amiden IV verknüpft. Dabei benutzt man übliche Peptid-Kupplungs-Methoden, die entweder im C. R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publisher, 1989, Seite 972f. oder im Ilouben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, 4. Aufl., ES, Kap. V aufgeführt sind. Bevorzugt arbeitet man mit "aktivierten" Säurederivaten von II, wobei die Säuregruppe COOH in eine Gruppe COL überführt wird. L stellt eine Abgangsgruppe wie zum Beispiel Cl, Imidazol und N-Hydroxybenzotriazol dar. Diese aktivierte Säure wird anschließend mit Aminen zu den Amiden IV umgesetzt. Die Reaktion erfolgt in wasserfreien, inerten Lösungsmitteln wie Methylenchlorid, Tetrahydrofuran und Dimethylformamid bei Temperaturen von -20 bis +25°C.

Diese Karbonsäureester IV (R'=O-Alkyl) werden mit Säuren wie Trifluoressigsäure oder Salzsäure oder Basen wie Lithiumhydroxid, Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid in wässrigen Medium oder in Gemischen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln wie Alkohole oder Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur oder erhöhten Temperaturen, wie 25-100°C, in die Säuren IV (R'=H) überführt.

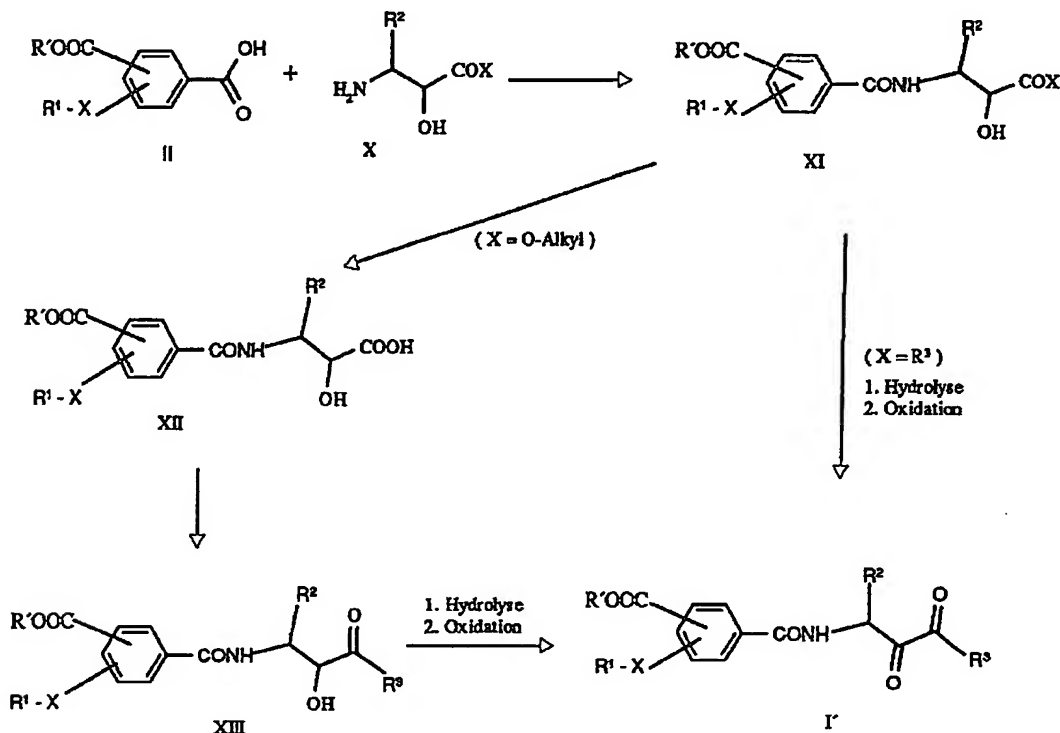
Diese erhaltenen Derivate IV (R'=H) können zu den erfindungsgemäßen Aldehyd-Derivaten I oxidiert werden. Dafür kann man verschiedene übliche Oxidationsreaktionen (siehe C. R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publisher, 1989, Seite 604f.) wie zum Beispiel Swern- und Swern-analoge Oxidationen (T. T. Tidwell, Synthesis 1990, 857-70), Natriumhypochlorid/TEMPO (S. L. Harbenson et al., siehe oben) oder Dess-Martin (J. Org. Chem. 1983, 48, 4155) benutzen. Bevorzugt arbeitet man hier in inerten aprotischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid, Tetrahydrofuran oder Methylenchlorid mit Oxidationsmitteln wie DMSO/py×SO₃ oder DMSO/Oxalylchlorid bei Temperaturen von -50 bis +25°C, je nach Methode (siehe obige Literatur).

Alternativ kann man die Karbonsäure II mit Aminohydroxamsäure-Derivate VI zu Benzamiden VII umsetzen. Dabei bedient man sich der gleichen Reaktionsführung wie bei der Darstellung von IV. Die Hydroxam-Derivate VI sind aus den geschützten Aminosäuren V durch Umsatz mit einem Hydroxylamin erhältlich. Dabei benutzt auch hier ein bereits beschriebenes Amidherstellungsverfahren. Die Abspaltung der Schutzgruppe P, zum Beispiel Boc, erfolgt in üblicher-
weise, zum Beispiel mit Trifluoressigsäure. Die so erhaltenen Amid-hydroxamsäuren VII können durch Reduktion in die erfindungsgemäßen Aldehyde I umgewandelt werden. Dabei benutzt man zum Beispiel Lithiumaluminiumhydrid als Reduktionsmittel bei Temperaturen von -60 bis 0°C in inerten Lösungsmitteln wie Tetrahydrofuran oder Ether.

Analog zum letzten Verfahren kann man auch Karbonsäuren oder Säure-Derivate, wie Ester IX ($\text{Y}=\text{COOR}'$, COSR') herstellen, die ebenfalls durch Reduktion in die erfindungsgemäßen Aldehyde I überführt werden können. Diese Verfahren sind in R. C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publisher, 1989, Seite 619-26 aufgelistet.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen substituierten Amide I, eine Ketoamid- oder Ketoester-Gruppe tragen, kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, die in den Syntheschema 2 skizziert wurden.

Syntheschema 2



Die Karbonsäuren II werden mit Aminohydroxykarbonsäure-Derivaten X (Herstellung von XI siehe S. L. Harbenson et al., J. Med. Chem. 1994, 37, 2918-29 oder J. P. Burkhardt et al. Tetrahedron Lett. 1988, 29, 3433-3436) unter üblichen Peptid-Kupplungs-Methoden (siehe oben, Houben-Weyl) umgesetzt, wobei Amide XIII anfallen.

Diese Karbonsäureester XIII ($\text{R}'=\text{O-Alkyl}$) werden mit Säuren wie Trifluoressigsäure oder Salzsäure oder Basen wie Lithiumhydroxid, Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid in wässrigen Medium oder in Gemischen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln wie Alkohole oder Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur oder erhöhten Temperaturen, wie $25-100^{\circ}\text{C}$, in die Säuren XIII ($\text{R}'=\text{H}$) überführt.

Die erhaltenen Derivate XIII können zu den erfindungsgemäßen Ketokarbonsäure-Derivaten I' oxidiert werden. Dafür kann man verschiedene übliche Oxidationsreaktionen (siehe C. R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publisher, 1989, Seite 604f.) wie zum Beispiel Swern- und Swern-analoge Oxidationen, bevorzugt Dimethylsulfoxid/Pyridin-Schwefeltrioxid-Komplex in Lösungsmitteln wie Methylenchlorid oder Tetrahydrofuran, gegebenenfalls unter Zusatz von Dimethylsulfoxid, bei Raumtemperatur oder Temperaturen von -50 bis 25°C , (I. T. Tidwell, Synthesis 1990, 857-70) oder Natriumhypochlorid/TEMPO (S. L. Harbenson et al., siehe oben), benutzen.

Wenn XI α -Hydroxyester darstellen ($\text{X}=\text{O-Alkyl}$), können diese zu Karbonsäuren XII hydrolysiert werden, wobei analog zu den obigen Methoden gearbeitet wird, bevorzugt aber mit Lithiumhydroxid in Wasser/Tetrahydrofuran-Gemischen bei Raumtemperatur, wobei aber zu beachten gilt, daß in diesem Falle für die Schutzgruppe R' ein Rest gewählt wird, wie zum Beispiel tert.-Butyl-O, der die selektive Spaltung einer der beiden Ester-Gruppen erlaubt. Die Herstellung von anderen Amiden XIII erfolgt durch Umsetzung mit Aminen unter bereits beschriebenen Kupplungsbedingungen. Das Alkohol-Derivat XIII kann erneut zu erfindungsgemäßen Ketokarbonsäure-Derivaten I' oxidiert werden.

Die Herstellung der Karbonsäureester II sind teilweise bereits beschrieben worden oder erfolgt entsprechend üblicher chemischen Methoden.

Verbindungen, bei denen X eine Bindung darstellt, werden durch übliche aromatische Kupplung, zum Beispiel die Suzuki-Kupplung mit Borsäure-Derivaten und Halogenide unter Palladiumkatalyse oder Kupferkatalytische Kupplung von aromatischen Halogeniden, hergestellt. Die Alkyl-überbrückten Reste ($\text{X} = -(\text{CH}_2)_m-$) können durch Reduktion der ana-

logen Ketone oder durch Alkylierung der Organolithium, z. B. ortho-Phenylloxazolidine, oder anderer Organometallverbindungen hergestellt werden (vgl. I. M. Dordor, et al., J.Chem.Soc. Perkin Trans. I, 1984, 1247-52).

Alken- und Alkin-überbrückte Verbindungen werden zum Beispiel durch Heck-Reaktion aus aromatischen Halogeniden und entsprechenden Alkenen und Aminen hergestellt (vgl. I. Sakamoto et al., Chem.Pharm.Bull., 1986, 34, 2754-59).

Amide und Sulfonamide werden analog den oben beschriebenen Methoden aus den Aminen und Säure-Derivaten hergestellt.

Alternativ können Verbindungen der allgemeinen Formel I auch durch Veränderung bzw. Vertauschung der Reaktionssequenzen, die in den Schemata 1 und 2 aufgelistet sind, synthetisiert werden. So kann zum Beispiel ein Sulfonamid I ($R^1X = RSO_2NH$) aus einem Derivat IV ($R^1X = NO_2$) hergestellt werden, indem die Nitro-Gruppe in üblicherweise katalytisch mit Wasserstoff an einem Katalysator, wie Palladium/Kohle, zum Amin reduziert und anschließend das erhaltene Amin mit einem Sulfonsäurechlorid zu einem Derivat IV ($R^1X = RSO_2NH$) umgesetzt wird. Die weitere Reaktion zu I erfolgt, wie im Schema gezeigt, durch Ester-Hydrolyse und Oxidation. Analog lassen sich die Zwischenstufen IV und XI ($R^1X =$ chemische Gruppen wie Nitro, Amino, Halogen usw.), in Derivate überführen, bei denen R^1X weitere im allgemeinen Anspruch aufgeführte Reste entspricht. Die Reaktionen werden dabei analog den oben beschriebenen Verfahren oder analog allgemeiner bzw. üblicher Methoden durchgeführt.

Die in der vorliegenden Erfindung enthaltenen heterozyklisch substituierte Amide I stellen Inhibitoren von Cystein-Proteasen dar, insbesondere Cystein-Proteasen wie die Calpaine I und II und Cathepsine B bzw. L.

Die inhibitorische Wirkung der heterozyklisch substituierte Amide I wurde mit in der Literatur üblichen Enzymtests ermittelt, wobei als Wirkmaßstab eine Konzentration des Inhibitors ermittelt wurde, bei der 50% der Enzymaktivität gehemmt wird (= IC_{50}). Die Amide I wurden in dieser Weise auf Hemmwirkung von Calpain I, Calpain II und Cathepsin B gemessen.

Cathepsin B-Test

Die Cathepsin B-Hemmung wurde analog einer Methode von S. Hasnain et al., J.Biol.Chem. 1993, 268, 235-40 bestimmt.

Zu 88 · L Cathepsin B (Cathepsin B aus menschlicher Leber (Calbiochem), verdünnt auf 5 Units in 500 · M Puffer) werden 2 · l einer Inhibitor-Lösung, hergestellt aus Inhibitor und DMSO (Endkonzentrationen: 100 · M bis 0,01 · M). Dieser Ansatz wird für 60 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) vorinkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 10 · l 10 mM 7-Arg-Arg-pNA (in Puffer mit 10% DMSO) gestartet. Die Reaktion wird 30 Minuten bei 405 nm im Mikrotiterplattenreader verfolgt. Aus den maximalen Steigungen werden anschließend die IC_{50} 's bestimmt.

Glutamat induzierter Zelltod an corticalen Neuronen

Der Test wurde, wie bei Choi D. W., Maulucci-Gedde M. A. and Kriegstein A. R., "Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture". J. Neurosci. 1989, 7, 357-368, durchgeführt.

Aus 15 Tage alten Mäuseembryos wurden die Cortexhälften präpariert und die Einzelzellen enzymatisch (Trypsin) gewonnen. Diese Zellen (Glia und corticale Neuronen) werden in 24 Well-Platten ausgesät. Nach drei Tagen (Laminin beschichteten Platten) oder sieben Tagen (Ornithin beschichteten Platten) wird mit TDU (5-Fluor-2-Desoxyuridine) die Mitosebehandlung durchgeführt. 15 Tage nach der Zellpräparation wird durch Zugabe von Glutamat (15 Minuten) der Zelltod ausgelöst. Nach der Glutamatentfernung werden die Calpaininhibitoren zugegeben. 24 Stunden später wird durch die Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand die Zellschädigung ermittelt.

Man postuliert, daß Calpain auch eine Rolle im apoptotischen Zelltod spielt (M. K. T. Squier et al. J.Cell.Physiol. 1994, 159, 229-237; T. Patel et al. Faseb Journal 1996, 590, 587-597). Deshalb wurde in einem weiteren Modell in einer humanen Zelllinie der Zelltod mit Kalzium in Gegenwart eines Kalziumionophors ausgelöst. Calpain-Inhibitoren müssen in die Zelle gelangen und dort Calpain hemmen, um den ausgelösten Zelltod zu verhindern.

Kalzium-vermittelter Zelltod in NT2 Zellen

In der humanen Zelllinie NT2 läßt sich durch Kalzium in Gegenwart des Ionophors A 23187 der Zelltod auslösen. 10⁵ Zellen/well wurden in Mikrotiterplatten 20 Stunden vor dem Versuch ausplattiert. Nach diesem Zeitraum wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Inhibitoren in Gegenwart von 2,5 · M Ionophor und 5 mM Kalzium inkubiert. Dem Reaktionsansatz wurden nach 5 Stunden 0,05 ml XTT (Cell Proliferation Kit II, Boehringer Mannheim) hinzugegeben. Die optische Dichte wird ungefähr 17 Stunden später, entsprechend den Angaben des Herstellers, in dem Easy Reader EAR 400 der Firma SLT bestimmt. Die optische Dichte, bei der die Hälfte der Zellen abgestorben sind, errechnet sich aus den beiden Kontrollen mit Zellen ohne Inhibitoren, die in Abwesenheit und Gegenwart von Ionophor inkubiert wurden.

Calpain I und II Test

Die Testung der inhibitorischen Eigenschaften von Calpain-Inhibitoren erfolgt in Puffer mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,1 M NaCl; 1 mM Dithiothreitol; 0,11 mM Ca Cl₂, wobei das fluorogene Calpainsubstrats Suc-Leu-Tyr-AMC (25 mM gelöst in DMSO, Bachem/Schwyz) verwendet wird. Humanes -Calpain wird aus Erythrozyten isoliert und nach mehreren chromatographischen Schritten (DEAE-Sephrose, Phenyl-Sephrose, Superdex 200 und Blue-Sephrose) erhält man Enzym mit einer Reinheit >95%, beurteilt nach SDS-PAGE, Western Blot Analyse und N-terminaler Sequenzierung. Die Fluoreszenz des Spaltproduktes 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) wird in einem Spex-Fluorolog Fluorimeter bei $\lambda_{ex} = 380$ nm und $\lambda_{em} = 460$ nm verfolgt. In einem Meßbereich von 60 min ist die Spaltung des Substrats linear

und die autokatalytische Aktivität von Calpain gering, wenn die Versuche bei Temperaturen von 12°C durchgeführt werden. Die Inhibitoren und das Calpainsubstrat werden in den Versuchsansatz als DMSO-Lösungen gegeben, wobei DMSO in der Endkonzentration 2% nicht überschreiten soll.

In einem Versuchsansatz werden 10 l Substrat (250 M final) und anschließend 10 · l an · -Calpain (2 · g/ml final, d. h. 18 nM) in eine 1 ml Küvette gegeben, die Puffer enthält. Die Calpain-vermittelte Spaltung des Substrats wird für 15–20 min. gemessen. Anschließend Zugabe von 10 · l Inhibitor (50–100 · M Lösung in DMSO) und Messung der Inhibition der Spaltung für weitere 40 min.

K_i -Werte werden nach der klassischen Gleichung für reversible Hemmung bestimmt:

$K_i = I/(v_0/v_i) - 1$; wobei I = Inhibitorkonzentration, v_0 = Anfangsgeschwindigkeit vor Zugabe des Inhibitors; v_i = Reaktionsgeschwindigkeit im Gleichgewicht.

Die Geschwindigkeit wird errechnet aus v = Freisetzung AMC/Zeit d. h. Höhe/Zeit.

Calpain ist eine intrazelluläre Cysteinprotease. Calpain-Inhibitoren müssen die Zellmembran passieren, um den Abbau von intrazellulären Proteinen durch Calpain zu verhindern. Einige bekannte Calpain-Inhibitoren, wie zum Beispiel F 64 und Leupeptin, überwinden die Zellmembranen nur schlecht und zeigen dementsprechend, obwohl sie gute Calpain-Inhibitoren darstellen, nur schlechte Wirkung an Zellen. Ziel ist es, Verbindungen mit besser Membrangängigkeit zu finden. Als Nachweis der Membrangängigkeit von Calpain-Inhibitoren benutzen wir humane Plättchen.

Calpain-vermittelter Abbau der Tyrosinkinase pp60^{src} in Plättchen

Nach der Aktivierung von Plättchen wird die Tyrosinkinase pp60^{src} durch Calpain gespalten.

Dies wurde von Oda et al. in J.Biol.Chem., 1993, 268, 12603–12608 eingehend untersucht. Hierbei wurde gezeigt, daß die Spaltung von pp60^{src} durch Calpeptin, einen Inhibitor für Calpain, verhindert werden kann. In Anlehnung an diese Publikation wurde die zelluläre Effektivität unserer Substanzen getestet. Frisches humanes, mit Zitrat versetztes Blut wurde 15 min. bei 200 g zentrifugiert. Das Plättchen-reiche Plasma wurde gepoolt und mit Plättchenpuffer 1 : 1 verdünnt (Plättchenpuffer: 68 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂ × 6 H₂O, 0,24 mM NaH₂PO₄ × H₂O, 12 mM NaHCO₃, 5,6 mM Glukose, 1 mM EDTA, pH 7,4).

Nach einem Zentrifugations- und Waschschrift mit Plättchenpuffer wurden die Plättchen auf 10⁷ Zellen/ml eingestellt. Die Isolierung der humanen Plättchen erfolgte bei RT.

Im Testansatz wurden isolierte Plättchen (2 × 10⁶) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Inhibitoren (gelöst in DMSO) für 5 min. bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Aktivierung der Plättchen mit 1 · M Ionophor A23187 und 5 mM CaCl₂. Nach 5 min. Inkubation wurden die Plättchen kurz bei 13 000 rpm zentrifugiert und das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen (SDS-Probenpuffer: 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 5 · g/ml Leupeptin, 10 · g/ml Pepstatin, 10% Glycerin und 1% SDS). Die Proteine wurden in einem 12%igen Gel aufgetrennt und pp60^{src} und dessen 52-kDa und 47-kDa Spaltprodukte durch Western-Blotting identifiziert. Der verwendete polyklonale Kaninchen-Antikörper Anti-Cys-src (pp60^{src}) wurde von der Firma Biomol Feinchemikalien (Hamburg) erworben. Dieser primäre Antikörper wurde mit einem HRP-gekoppelten zweiten Antikörper aus der Ziege (Boehringer Mannheim, FRG) nachgewiesen.

Die Durchführung des Western-Blotting erfolgte nach bekannten Methoden. Die Quantifizierung der Spaltung von pp60^{src} erfolgte densitometrisch, wobei als Kontrollen nicht-aktivierte (Kontrolle 1: keine Spaltung) und mit Ionophor- und Kalzium-behandelte Plättchen (Kontrolle 2: entspricht 100% Spaltung) verwendet wurden. Der ED₅₀-Wert entspricht der Konzentration an Inhibitor bei der die Intensität der Farbreaktion um 50% reduziert wird.

Bei einer Reihe von neurologischen Krankheiten oder psychischen Störungen treten erhöhte Glutamat-Aktivitäten auf, die zu Zuständen von Übererregungen oder toxischen Effekten im zentralen Nervensystem (ZNS) führen. Glutamat vermittelt seine Effekte über verschiedene Rezeptoren. Zwei von diesen Rezeptoren werden nach den spezifischen Agonisten NMDA-Rezeptor und AMPA-Rezeptor klassifiziert. Antagonisten gegen diese Glutamat vermittelten Effekte können somit zur Behandlung dieser Krankheiten eingesetzt werden, insbesondere zur therapeutischen Anwendung gegen neurodegenerativen Krankheiten wie Chorea Huntington und Parkinson'sche Krankheit, neurotoxischen Störungen nach Hypoxie, Anoxie, Ischämie und nach Läsionen, wie sie nach Schlaganfall und Trauma auftreten, oder auch als Antiepileptika (vgl. Arzneim.Forschung 1990, 40, 511–514; TIPS, 1990, 11, 334–338; Drugs of the Future 1989, 14, 1059–1071).

Schutz gegen zerebrale Übererregung durch exzitatorische Aminosäuren (NMDA- bzw. AMPA-Antagonismus an der Maus)

Durch intrazerebrale Applikation von exzitatorischen Aminosäuren EAA (Excitatory Amino Acids) wird eine so massive Übererregung induziert, daß diese in kurzer Zeit zu Krämpfen und zum Tode der Tiere (Maus) führt. Durch systemische, z. B. intraperitoneale, Gabe von zentralwirksamen Wirkstoffen (EAA-Antagonisten) lassen sich diese Symptome hemmen. Da die excessive Aktivierung von EAA-Rezeptoren des Zentralnervensystems in der Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielt, kann aus dem nachgewiesenen EAA-Antagonismus in vivo auf eine mögliche therapeutische Verwendbarkeit der Substanzen gegen derartige ZNS-Erkrankungen geschlossen werden. Als Maß für die Wirksamkeit der Substanzen wurde ein ED₅₀-Wert bestimmt, bei dem 50% der Tiere durch eine festgelegte Dosis von entweder NMDA oder AMPA durch die vorangegangene ip.-Gabe der Meßsubstanz symptomfrei werden.

Die heterozyklisch substituierten Amide I stellen Inhibitoren von Cystein-Derivate wie Calpain I bzw. II und Cathepsin B bzw. L dar und können somit zur Bekämpfung von Krankheiten, die mit einer erhöhten Enzymaktivität der Calpain-Enzyme oder Cathepsin-Enzyme verbunden sind, dienen. Die vorliegenden Amide I können danach zur Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten, die nach Ischämie, Trauma, Subarachnoidal-Blutungen und Stroke auftreten, und von neurodegenerativen Krankheiten wie multipler Infarkt-Dementia, Alzheimer Krankheit, Huntington Krankheit

und von Epilepsien und weiterhin zur Behandlung von Schädigungen des Herzens nach cardialen Ischämien, Schädigungen der Nieren nach renalen Ischämien, Skelettmuskelschädigungen, Muskeldystrophien, Schädigungen, die durch Proliferation der glatten Muskelzellen entstehen, coronaren Vasospasmen, cerebralen Vasospasmen, Katarakten der Augen, Restenosis der Blutbahnen nach Angioplastic dienen. Zudem können die Amide I bei der Chemotherapie von Tumoren und deren Metastasierung nützlich sein und zur Behandlung von Krankheiten, bei denen ein erhöhter Interleukin-1-Spiegel auftritt, wie bei Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen, dienen.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittelzubereitungen enthalten neben den üblichen Arzneimittelhilfsstoffen eine therapeutisch wirksame Menge der Verbindungen I.

Für die lokale äußere Anwendung, zum Beispiel in Puder, Salben oder Sprays, können die Wirkstoffe in den üblichen Konzentrationen enthalten sein. In der Regel sind die Wirkstoffe in einer Menge von 0,001 bis 1 Gew.-%, vorzugsweise 0,001 bis 0,1 Gew.-% enthalten.

Bei der inneren Anwendung werden die Präparationen in Einzeldosen verabreicht. In einer Einzeldosis werden pro kg Körpergewicht 0,1 bis 100 mg gegeben. Die Zubereitung können täglich in einer oder mehreren Dosierungen je nach Art und Schwere der Erkrankungen verabreicht werden.

Entsprechend der gewünschten Applikationsart enthalten die erfindungsgemäßen Arzneimittelzubereitungen neben dem Wirkstoff die üblichen Trägerstoffe und Verdünnungsmittel. Für die lokale äußere Anwendung können pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe, wie Ethanol, Isopropanol, oxethyliertes Ricinusöl, oxethyliertes Hydriertes Ricinusöl, Polyacrylsäure, Polyethylenglykol, Polyethylenglykosterat, ethoxylierte Fettalkohole, Paraffinöl, Vaseline und Wollfett, verwendet werden. Für die innere Anwendung eignen sich zum Beispiel Milchsücker, Propylenglykol, Ethanol, Stärke, Talk und Polyvinylpyrrolidon.

Ferner können Antioxidationsmittel wie Tocopherol und butyliertes Hydroxyanisol sowie butyliertes Hydroxytoluol, geschmacksverbessernde Zusatzstoffe, Stabilisierungs-, Emulgier- und Gleitmittel enthalten sein.

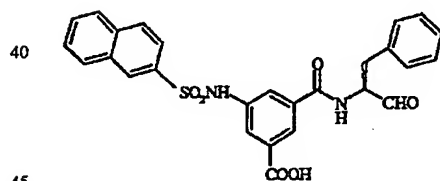
Die neben dem Wirkstoff in der Zubereitung enthaltenen Stoffe sowie die bei der Herstellung der pharmazeutischen Zubereitungen verwendeten Stoffe sind toxikologisch unbedenklich und mit dem jeweiligen Wirkstoff verträglich. Die Herstellung der Arzneimittelzubereitungen erfolgt in üblicher Weise, zum Beispiel durch Vermischung des Wirkstoffes mit anderen üblichen Trägerstoffen und Verdünnungsmitteln.

Die Arzneimittelzubereitungen können in verschiedenen Applikationsweisen verabreicht werden, zum Beispiel peroral, parenteral wie intravenös durch Infusion, subkutan, intraperitoneal und topisch. So sind Zubereitungsformen wie Tabletten, Emulsionen, Infusions- und Injektionslösungen, Pasten, Salben, Gele, Cremes, Lotionen, Puder und Sprays möglich.

Beispiele

Beispiel 1

(S)-3-Carboxy-5(2-naphthylsulfonamido)-N(3-phenyl-propan-1-ol-2-yl)-benzamid



a) (S)-3-Ethoxycarbonyl-5-nitro-N(3-phenyl-propan-1-ol-2-yl)-benzamid

10 g (41.8 mMol) 5-Nitro-isophthalsäuremonoethylester, 6.3 g (41.8 mMol) (S)-Phenylalaninol und 10.6 g (104.5 mMol) Triethylamin wurden bei Raumtemperatur in 200 ml Methylenchlorid gelöst und für 30 Minuten gerührt. Danach gab man unter Eiskühlung 1.9 g (13.9 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und anschließend portionsweise 8 g (41.6 mMol) (N-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid zu. Alles wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit Methylenchlorid auf das doppelte Volumen verdünnt und nacheinander mit 2 M Salzsäure, Wasser, 2 M Natronlauge und erneut Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingeengt. Man erhielt 9.1 g des Zwischenproduktes

b) (S)-5-Amin-3-ethoxycarbonyl-N(3-phenyl-propan-1-ol-2-yl)-benzamid

9 g (24.3 mMol) des Zwischenproduktes 1a wurden in 300 ml Ethanol gelöst und nach Zugabe von 1 g Palladium/Kohle (10%ig) hydriert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Man erhielt 8.1 g des Zwischenproduktes.

c) (S)-3-Ethoxycarbonyl-5(2-naphthylsulfonamido)-N(3-phenyl-propan-1-ol-2-yl)-benzamid

2 g (5.84 mMol) des Zwischenproduktes 1b und 2.4 ml (17.5 mMol) Triethylamin wurden in 50 ml Tetrahydrofuran gelöst. Bei 0°C tropfte man anschließend eine Lösung aus 1.32 g (5.82 mMol) 2-Naphthalinsulfonsäurechlorid in 30 ml Tetrahydrofuran zu und rührte anschließend den Reaktionsansatz für 8 h bei 40°C. Danach wurde der Reaktionsansatz im

Vakuum eingeeengt und der Rückstand zwischen Wasser und Essigester verteilt. Die Essigester-Phase wurde noch mit 2 M Salzsäure und Wasser gewaschen und anschließend getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der so erhaltene Rückstand wurde chromatographisch an Kieselgel (Fleckmittel: Methylenchlorid/Ethanol = 20/1) gereinigt, wobei 0.65 g des Zwischenproduktes erhalten wurden.

d) (S)-3-Carboxy-5(2-naphthylsulfonamido)-N(3-phenyl-propan-1-ol-2-yl)-benzamid

0.65 g (1.2 mMol) des Zwischenproduktes 1c wurden in 30 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 0.15 g (6.3 mMol) Lithiumhydroxid, gelöst in 15 ml Wasser, versetzt. Alles wurde für 26 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der wäßrige Rückstand mit 2 M Salzsäure angesäuert. Der anfallende Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Man erhielt 0.46 g des Zwischenproduktes.

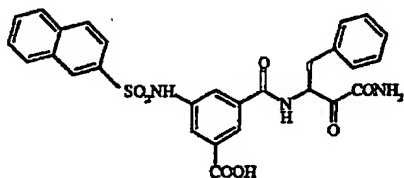
e) (S)-3-Carboxy-5(2-naphthylsulfonamido)-N(3-phenyl-propan-1-ol-2-yl)-benzamid

0.46 g (0.91 mMol) der Zwischenverbindung 1d und 0.37 g (3.65 mMol) Triethylamin wurden in 10 ml trockenem Dimethylsulfoxid gelöst und mit 0.44 g (2.76 mMol) Pyridin-Schwefeltrioxid-Komplex versetzt. Alles wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Eiswasser gegeben, mit 1 M Salzsäure angesäuert und der Niederschlag abgesaugt. Man erhielt 0.36 g des Produktes.

¹H-NMR (D₆-DMSO): δ = 2.9 (1H), 3.3 (1H), 4.5 (1H), 7.2 (5H), 7.6–7.9 (5H), 8.0–8.2 (4H), 8.5 (2H), 9.1 (1H), 9.6 (1H) und 10.9 (1H) ppm.

Beispiel 2

N(1-Carbamoyl-2-oxo-4-phenyl-propan-2-yl)-3-carboxy-5(2-naphthylsulfonamido)-benzamid



a) N(1-Carbamoyl-2-hydroxy-4-phenyl-propan-2-yl)-3-ethoxycarbonyl-5-nitro-benzamid

5.2 g (21.7 mMol) 5-Nitro-isophthalsäuremonoethylester, 5 g (21.7 mMol) 3-Amino-2-hydroxy-3-phenyl-buttersäureamid und 11.2 g (110.5 mMol) Triethylamin wurden bei Raumtemperatur in 200 ml Methylenchlorid gelöst und für 30 Minuten gerührt. Danach gab man unter Eiskühlung 2.9 g (21.6 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und anschließend portionsweise 4.6 g (22.8 mMol) (N-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid zu. Alles wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit Methylenchlorid auf das doppelte Volumen verdünnt und nacheinander mit 2 M Salzsäure, Wasser, 2 M Natronlauge und erneut Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt 2.6 g des Zwischenproduktes.

b) 5-Amino-N(1-carbamoyl-2-hydroxy-4-phenyl-propan-2-yl)-3-ethoxycarbonyl-benzamid

2.6 g (6.25 mMol) des Zwischenproduktes 2a wurden in 50 ml Dimethylformamid gelöst, mit 200 ml Ethanol verdünnt und nach Zugabe von 1 g Palladium/Kohle (10%ig) hydriert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz filtriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Man erhielt 1.8 g des Zwischenproduktes.

c) N(1-Carbamoyl-2-hydroxy-4-phenyl-propan-2-yl)-3-ethoxycarbonyl-5(2-naphthylsulfonamido)-benzamid

1.8 g (4.7 mMol) des Zwischenproduktes 2b und eine Spatelspitze 4-Dimethylaminopyridin wurden in 30 ml Pyridin gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 1.2 g (5.1 mMol) Naphthalinsulfonsäurechlorid zutropft und alles noch für 16 h gerührt. Danach wurde der Reaktionsansatz auf Eiswasser gegossen und mit 2 M Salzsäure angesäuert. Diese wäßrige Phase wurde mehrmals mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phase wurden getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der so erhaltene Rückstand wurde nacheinander noch mit Ether und wenig Essigester behandelt, wobei 1.3 g des Zwischenproduktes erhalten wurden.

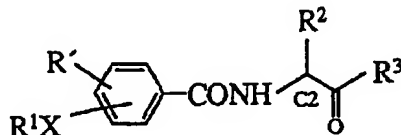
d) N(1-Carbamoyl-2-hydroxy-4-phenyl-propan-2-yl)-3-carboxy-5(2-naphthylsulfonamido)-benzamid

1.25 g (2.2 mMol) des Zwischenproduktes 3c wurden in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 0.21 g (8.7 mMol) Lithiumhydroxid, gelöst in 50 ml Wasser, versetzt. Alles wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der wäßrige Rückstand mit 2 M Salzsäure angesäuert. Der anfallende Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Man erhielt 1.0 g des Zwischenproduktes.

e) N(1-Carbamoyl-2-oxo-4-phenyl-propan-2-yl)-3-carboxy-5(2-naphthylsulfonamido)-benzamid

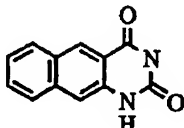
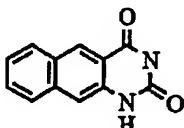
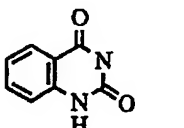
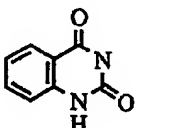
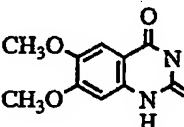
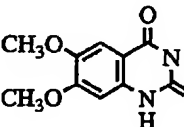
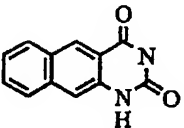
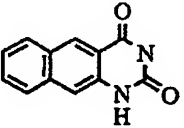
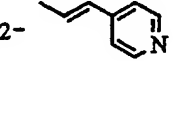
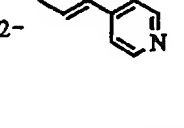
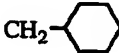
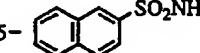
0.9 g (1.6 mMol) der Zwischenverbindung 2d und 1.4 ml (9.9 mMol) Triethylamin wurden in 25 ml trockenem Dimethylsulfoxid gelöst und bei Raumtemperatur mit 0.78 g (4.9 mMol) Pyridin-Schwefeltrioxid-Komplex, gelöst in 13 ml Dimethylsulfoxid, versetzt. Alles wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Eiswasser gegeben, mit 1 M Salzsäure angesäuert und der Niederschlag abgesaugt, wobei 0.59 g des Produktes anfielen.

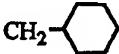
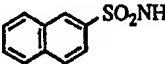
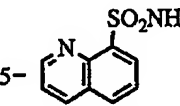
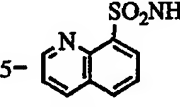
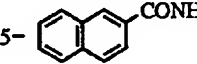
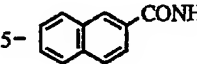
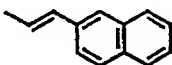
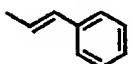
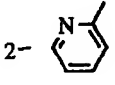
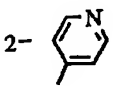
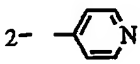
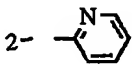
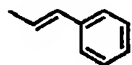
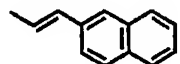
Folgende Beispiele können analog der obigen Vorschriften hergestellt werden:



Beispiel	R'	R ²	R ³	R ¹ X
2	3-COOH	(CH ₂) ₃ CH ₃	CONH ₂	5-Naphth-2-yl-SO ₂ NH
3	3-COOH	CH ₂ Ph	H	5-Phenyl-SO ₂ NH
4	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	5-Phenyl-SO ₂ NH
5	3-COOH	CH ₂ Ph	H	5-n-Butyl-SO ₂ NH
6	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	5-n-Butyl-SO ₂ NH
7	4-COOH	CH ₂ Ph	H	3-Phenyl-SO ₂ NH
8	4-COOH	CH ₂ Ph	H	5-Naphth-2-yl-SO ₂ NH
9	4-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	5-Naphth-2-yl-SO ₂ NH
10	4-COOH	CH ₂ Ph	H	2-CH=CH-Phenyl
11	4-COOH	CH ₂ Ph	H	2-(Pyrid-2-yl)
12	3-COOH	CH ₂ Ph	H	2-CH=CH-Phenyl

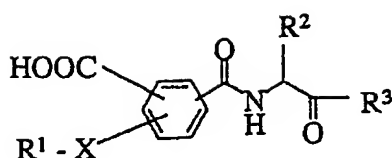
Wenn R³ = H, dann ist die Konfiguration C2-Atom (S), im Falle von R³ = CONH₂ ist diese (R,S).

Beispiel	R ¹	R ²	R ³	R ¹ _x	
13	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂		5
14	3-COOH	CH ₂ Ph	H		10
15	3-COOH	CH ₂ Ph	H		15
16	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂		20
17	3-COOH	CH ₂ Ph	H		25
18	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂		30
19	3-COOH	(CH ₂) ₃ CH ₃	H		35
20	3-COOH	(CH ₂) ₃ CH ₃	CONH ₂		40
21	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂		45
22	3-COOH	CH ₂ Ph	H		50
23	3-COOH		H		55
					60
					65

Beispiel	R ¹	R ²	R ³	R ¹ _x
24	3-COOH		CONH ₂	5- 
25	3-COOH	CH ₂ Ph	H	5- 
26	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	5- 
27	3-COOH	CH ₂ Ph	H	5- 
28	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	5- 
29	4-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	
30	4-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	
31	4-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	2- 
32	4-COOH	CH ₂ Ph	H	2- 
33	4-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	2- 
34	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	2- 
35	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	
36	3-COOH	CH ₂ Ph	CONH ₂	

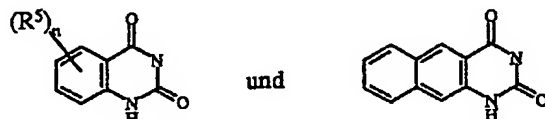
Patentansprüche

1. Amide der allgemeinen Formel I



und ihre tautomeren und isomeren Formen, möglichen enantiomeren und diastereomeren Formen, sowie mögliche physiologisch verträgliche Salze, worin die Variablen folgende Bedeutung haben:

R¹ C₁-C₆-Alkyl, Phenyl, Naphthyl, Chinolyl, Pyridyl, Pyrimidyl, Pyridazyl, Chinazolyl und Chinoxalyl bedeuten kann, wobei die Ringe noch mit zu bis 2 Resten R⁴ substituiert sein können, und
 R² -(CH₂)_m-R⁸, wobei R⁸ Phenyl, Cyclohexyl- oder Indolyl und m=1 bis 6 sein kann, und
 X eine Bindung, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -C≡C-, -CONH-, -SO₂NH-, und bedeutet und
 R¹-X zusammen auch



bedeuten und

R³ Wasserstoff und CO-NR⁶R⁷ bedeutet,

R⁴ Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, verzweigt oder unverzweigt und -O-C₁-C₄-Alkyl bedeutet;

R⁵ Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, verzweigt oder unverzweigt und -O-C₁-C₄-Alkyl bedeutet;

R⁶ Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl, verzweigt und unverzweigt, bedeutet, und

R⁷ Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl, verzweigt oder unverzweigt, bedeutet, und

n eine Zahl 0, 1 oder 2 bedeutet bedeutet.

2. Amide der Formel I gemäß dem Anspruch 1, wobei

R¹ Phenyl, Naphthyl, Butyl und Chinolyl

R² Benzyl und

R³ Wasserstoff und

X SO₂NH und

R⁴ Wasserstoff bedeutet.

3. Amide der Formel I gemäß dem Anspruch 1, wobei

R¹ Phenyl, Naphthyl, Butyl und Chinolyl

R² Benzyl und

R³ CONH₂ und

X SO₂NH und

R⁴ Wasserstoff bedeutet.

4. Verwendung von Amidinen der Formel I gemäß dem Anspruch 1-3 zur Behandlung von Krankheiten.

5. Verwendung von Amidinen der Formel I gemäß dem Anspruch 1-3 als Inhibitoren von Cysteinproteasen.

6. Verwendung nach Anspruch 5 als Inhibitoren von Cysteinproteasen wie Calpaine und Cathepsine, insbesondere Calpaine I und II und Cathepsine B und L.

7. Verwendung von Amidinen der Formel I gemäß dem Anspruch 1-3 zur Herstellung als Arzneimittel zur Behandlung von Krankheiten, bei denen erhöhte Calpain-Aktivitäten auftreten.

8. Verwendung der Amidinen der Formel I gemäß dem Anspruch 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten und neuronalen Schädigungen.

9. Verwendung nach Anspruch 8 zur Behandlung von solchen neurodegenerativen Krankheiten und neuronalen Schädigungen, die durch Ischämie, Trauma oder Massenblutungen ausgelöst werden.

10. Verwendung nach Anspruch 9 zur Behandlung von Hirnschlag und Schädel-Hirntrauma.

11. Verwendung nach Anspruch 9 zur Behandlung von Alzheimer'schen Krankheit und der Huntington-Krankheit.

12. Verwendung nach Anspruch 9 zur Behandlung von Epilepsien.

13. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß dem Anspruch 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln und Behandlung von Schädigungen des Herzens nach cardialen Ischämien, Schädigungen der Nieren nach renalen Ischämien, Skelett-muskelschädigungen, Muskeldystrophien, Schädigungen, die durch Proliferation der glatten Muskelzellen entstehen, coronarer Vasospasmus, cerebraler Vasospasmus, Katarakten der Augen und Restenosis der Blutbahnen nach Angioplastie.

14. Verwendung der Amidinen der Formel I gemäß dem Anspruch 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Tumoren und deren Metastasierung.

15. Verwendung der Amidinen der Formel I gemäß dem Anspruch 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krankheiten, bei denen erhöhte Interleukin-1-Spiegel auftreten.

16. Verwendung der Amide gemäß Anspruch 1-3 zur Behandlung von immunologischen Krankheiten wie Entzündungen und rheumatische Erkrankungen.

17. Arzneimittelzubereitungen zur peroralen, parenteralen und intraperitonealen Anwendung, enthaltend pro Einzeldosis, neben den üblichen Arzneimittelhilfsstoffen, mindestens eines Amides I gemäß Anspruch 1-3.

- Leerseite -

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.